

⑫ 公開特許公報(A) 平4-13684

⑤ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)1月17日

C 07 G 1/00
A 61 K 31/715
C 07 G 3/00
C 08 B 37/00
C 12 N 9/99

ADU

Q

8318-4H
9164-4C
8318-4H
7624-4C

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全6頁)

⑭ 発明の名称 リグニン配糖体およびその用途

⑮ 特 願 平2-113049

⑯ 出 願 平2(1990)4月28日

⑰ 発 明 者 田 沼 靖 一 東京都八王子市小門町1-10

⑱ 出 願 人 株式会社ミドリ十字 大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号

⑲ 代 理 人 弁理士 高 島 一

明 細 書

1. 発明の名称

リグニン配糖体およびその用途

2. 特許請求の範囲

(1) 以下の性質を有するリグニン配糖体。

(i) リグニンおよび多糖類が結合

(ii) 分子量は8000~10000

(iii) リグニンと多糖類の結合比は1:1~2:

1(分子比)

(iv) 多糖類はクロン酸10~20%、中性糖80~90%で構成されている。

(2) リグニン配糖体を主成分とするポリ(ADP-リボース)グリコヒドrolラーゼ阻害剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は新規なリグニン配糖体およびその用途に関する。

(従来技術・発明が解決しようとする課題)

現有の抗癌剤の殆どは、DNA合成あるいは細胞分裂を抑制する作用を持つが、これは正常細胞

に対しても同等な作用を示す。わすかに癌細胞は細胞分裂が速く、正常細胞は遅いと言う差を利用して、癌細胞に、より多くの障害を与えることで治療が成り立っている。正常細胞が受けた障害は、副作用として表現され、生体はその副作用にどこまで耐えられるかが、癌治療の上で重要なポイントとなっている。

以上の様に、本来の癌治療は癌細胞の生物学、生化学などに根ざすべきものであるが、現実にはその様な癌治療法にまで結びついていない。

さて、癌の原因と言うと発癌物質、放射線およびウイルスの3つが古くより言われてきた。その内、癌ウイルスの持つ遺伝情報により細胞が癌化することが明らかになり、oncogene(癌遺伝子)なる言葉が生まれた。その後、癌遺伝子は正常細胞にも存在し、それがある時スイッチオンされて、細胞が癌化するという仮説が立てられたのである。これは、時の流れと共に発展し、今日その大筋は正しかったことを誰しも認めるところである。

一方、高等動物のゲノムには癌遺伝子となり得

るproto-oncogeneは50種以上存在し、それらは正常細胞の増殖や分化に重要な生理機能を果たしている。それ故、細胞増殖や癌の制御の遺伝子のレベルもしくは遺伝子産物のレベルでのコントロールの可能性が生まれて来た。本発明は癌遺伝子発現の段階を、特異的阻害剤で抑制する癌治療剤を開発することにある。挿入されたマウス乳癌ウイルス(MMTV)遺伝子の発現がコレステロールにより制御されているマウス乳癌細胞を用い、MMTV遺伝子発現にはクロマチンタンパク質での脱ポリADP-リボース反応が引き金となっていることが見出されている。即ち、ポリADP-リボースが分解されることにより、その部分のクロマチン構造の局所変化が、最終的にはRNAポリメラーゼのプロモーターへの結合と転写促進につながると考えられている。(ジャーナル・バイオロジカル・ケミストリー、258:15371(1983))。

そこで、発明者はポリADP-リボースの分解を阻止すれば、癌遺伝子が活性化されなくなることが予想されたため、ADP-リボースの分解に

関与する酵素であるポリ(ADP-リボース)グリコヒドラーゼをヒト胎盤より分離精製し、本酵素に対し阻害作用をもつ化合物を検討した結果、幾つかの天然化合物に強い阻害活性を見出した。

そして、さらに検討を助め、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドラーゼ阻害に基づく抗癌作用を有する医薬品として使用に耐え得る新規化合物を見出し、本発明を完成した。

(課題を解決するための手段)

即ち、本発明は次の要旨を有するものである。

① 以下に示す性質を有するリグニン配糖体

- (i) リグニンおよび多糖類が結合
- (ii) 分子量は8000~10000
- (iii) リグニンと多糖類の結合比は1:1~2:1(分子比)
- (iv) 多糖類はウロン酸10~20%、中性糖80~90%で構成されている。

② リグニン配糖体を主成分とするポリ(ADP-リボース)グリコヒドラーゼ阻害剤。

本発明のリグニン配糖体は、リグニンと糖(多

糖類)との結合体である。リグニンと糖(多糖類)との結合はエーテル結合による。その結合比は、リグニン:構成糖の重量比で1~2:1程度が例示される。また、リグニンと多糖類との分子比で1~2:1程度が例示される。

リグニン配糖体の糖部分はウロン酸および中性糖より構成される。その組成としてはウロン酸10~20%、中性糖80~90%程度が例示される。

中性糖としては、グルコース、ガラクトース、マンノース、アラビノースが挙げられる。その組成としてはグルコース25~30mol%、ガラクトース40~45mol%、マンノース20~25mol%、アラビノース5~10mol%程度が例示される。

これらの構成糖は全体として糖鎖構造を取っており、多糖類を形成する。

リグニン配糖体の分子量は8000~10000程度であり、多糖類部分の分子量は2000~4000程度である。またリグニン部分は分子量4000±2000程度を有する。

本発明リグニン配糖体は、元素的にはC原子35~45重量%、H原子1~10重量%、O原子50~55重量%程度が例示される。

本発明のリグニン配糖体は以下のように調整される。

出発原料としては松かさ、茶(葉)、草みづき、三豆根等が挙げられる。

原料を各種溶媒(例えば、熱水、エタノール、アセトン等)で処理する。処理時間は1~15時間程度である。処理済み原料をアルカリ性溶液(0.1~1N水酸化ナトリウム、アンモニウム等)で抽出する。抽出液をpH4~6に調整し、等量のエタノールを添加して上清成分を回収する。上清成分をゲル濾過で精製して活性部分を回収する。

こうして得られたリグニン配糖体は透析、遠心分離、凍結乾燥等を施すことができる。

本発明のリグニン配糖体は、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドラーゼ阻害作用を有し、ヒトを含む哺乳動物(ヒト、ウマ、イヌ、マウス、モルモット、ラット等)に対してポリ(ADP-

リボース)グリコヒドラーゼ阻害活性を有し、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドラーゼ阻害剤として悪性腫瘍、ウイルス性感染症の治療、予防に有用なものである。

本発明のリグニン配糖体は、経口的または非経口的に投与される。

リグニン配糖体は、それ自体または製薬上許容されるキャリアとの医薬製剤の形で投与される。当該製剤は、自体既知の方法によって調製される。剤型としては、錠剤、カプセル剤、散剤、坐剤、注射剤等が例示される。

リグニン配糖体は、例えば、経口投与の場合、通常0.1~100mg/kg体重程度を1日1回または数回にわたって投与されるが、年齢、体重、および/または処置すべき病状の重度や治療に対する反応によりその投与量は変わりうる。

毒性実験

本発明のリグニン配糖体のマウスに対する毒性は、いずれも経口投与でLD₅₀値が100mg/kg以上であり、投与量にくらべてLD₅₀値が極めて

大きく、安全域の広い化合物である。

(実施例)

実施例1

以下の処理に付すことによってリグニン配糖体を抽出した。

例

松かさ

1 熱水抽出

煮沸時間は松かさの量、また水の量により異なるが通常2時間×3回行う。

2 エタノール抽出

熱水抽出した松かさを半乾燥状態のままエタノールに浸し一昼夜室温に置く。

3 アセトン抽出

エタノール抽出した松かさを半乾燥状態のままアセトンに浸し一昼夜室温に置く。

4 1 N水酸化ナトリウム(又はアンモニア)溶液抽出

アセトン抽出した松かさをランプにて乾燥させ、1 N水酸化ナトリウム溶液にて6時間(又は一昼夜)攪拌しながら抽出する。この抽出後に酢酸を加えてpHを5.0に戻す。沈降物は高速遠心により除去する。

エタノール沈降 抽出液に等量のエタノールを加え低温室に一昼夜置く。沈降物を高速遠心により除去し、上清を水に対して透析する。

凍結乾燥 透析後の溶液を凍結乾燥にて粉末にする。

ゲル濾過 凍結乾燥粉末をセファロース(Sephacrose) CL-4Bにて精製する(移動層は0.1N NaOH)。

活性フラクションを蒸留水に対して透析した後、凍結乾燥より粉末にする。この凍結乾燥粉末を10%エタノール溶かし、トヨパールHW-40Fにてさらに精製する。(移動層は10%エタノール)。活性フラクションを蒸留水に対して透析した後、凍結乾燥により粉末にする。

実施例2

リグニン配糖体の糖部分、グリコン(glycone)及び非糖部分、アグリコン(aglycone)の構造の特徴を検討するために、本配糖体をメタノリシス(メタノール-塩酸分解)、あるいは亜塩素酸塩(NaClO₂)法によりグリコンとアグリコンに分離して分析を行った。その結果は次の通りである。

(グリコンの分析)

糖組成 ^{a)}	(%)	(全重量%)
ウロン酸	1.4	15.1

中性糖 8.9 84.9

グリコンの5/6が中性糖であるという特徴を持つ。

中性糖の組成 (mol %)

グルコース	25.1
ガラクトース	43.1
マンノース	21.9
アラビノース	9.9
フコース	0

中性糖としてはグルコース、ガラクトース、マンノース、アラビノースを含むが、フコースは含まない。

a) クロロン酸はカルバザール法、中性糖はフェノール硫酸法で定量した。

b) 中性糖の組成はメタノリシスで生成するメチルグリコシドをトリメチル化した後ガスクロマトグラフィーで分析した。

(アグリコンの分析)

分子量: トヨパール HW-40F ゲル濾過法により 4000 ± 2000

$$280/260 = 1.03$$

UVスペクトルにより芳香族(おそらくフェノール)の存在を示す。

電子スピン共鳴(ESR)分析

リグニンと同様に $g = 2.004$ ESRシグナルが検出されることより安定なフリーラジカルを有する構造体を含むことを示す。なお、クニニンにはこの様なシグナルは見られない。

(リグニン配糖体の分析)

リグニン配糖体全体としての特徴

元素分析	(weight %)
C	40.38
H	4.85
O	54.74
N	0.03以下
S	0

窒素、硫黄を含有しないことより蛋白、硫酸基を含まずセファロース (Sephacrose) CL-4B ゲル濾過法による分子量は約9000である。

リグニンと糖の結合比は重量比で約1.5 : 1で

赤外吸収分析 (IR)

IRはKBrディスクにより測定した。

その結果、 $3500 \sim 3700 \text{ cm}^{-1}$ 範囲に 3400 cm^{-1} にピークをもつ吸収が検出された。この吸収はフェノール性水酸基の存在を示す。 1600 cm^{-1} 付近の吸収は芳香族二重結合を示す。 1700 cm^{-1} 付近にカルボニル基の吸収がないことよりタンニンに見られるようなエステル結合はなく、リグニンに見られるようなエーテル結合で重合している化合物であることを示す。

指紋領域も含めて全体のスペクトラムはリグニン(アルカリ)と極めて類似している。

以上のIRスペクトルの結果から本配糖体のアグリコンはタンニン様化合物ではなく、リグニン様化合物であると結論される。

紫外吸収(UV)分析

280 nm に最大吸収値、 260 nm に最小吸収値をもつ。

$$280/260 = 1.02$$

リグニンも同様のUVスペクトルをもつ

ある。

従って本配糖体は、糖部分(グリコン)として中性糖を全重量の約85%も含有するという特徴をもっている。中性糖としてはグルコース、ガラクトース、マンノース、アラビノースを含む。非糖部分(アグリコン)はリグニンより成るという特徴を有する。

本配糖体は糖の還元末端ラクトール水酸基がリグニンのアルコール性またはフェノール性水酸基と脱水縮合してエーテル状に結合したO-配糖体である。また、リグニンと糖の結合比が重量比で約1.5 : 1であり、特に、中性糖を多く含有する、分子量約9千のリグニン配糖体(アグリコンの特徴で分類した場合)である。

本配糖体の推定構造モデルは図面に示す通りである。

試験例1.

ポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼに対する阻害効果

アッセイ用バッファー(0.01%ウシ血清アル

ブミン-10mMメルカプトエタノール-50mMカリウム・リン酸、pH7.0)に、 ^3H -(ADP-リボース) ... を加え、その27 μg に被験物質およびヒト胎盤より調製した核由来、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドラーゼ溶液を加えて全量30 μg とした後、37℃にて1時間インキュベーションした。その後、DE81濾紙に反応液を吸収させ、水、エタノール、アセトンで濾紙を洗浄した後、それを乾燥させ、液体シンチレーションカウンターにて、未反応基質 ^3H -(ADP-リボース)を測定し、本酵素に対する試験物質の阻害作用を検討した。その結果を示したのが表1であり、用いた被験物質の全てが、用量依存的にポリ(ADP-リボース)グリコヒドラーゼを阻害した。

(以下余白)

る。この発現は env 部分の cDNA を用いることにより検出することが出来る。そこで、341株に被験物質を30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となる様に加え、37℃、30分間インキュベーションし、次に、その系に 10^{-6}M となる様にデキサメタゾンを添加し、さらに1時間インキュベーションした。その後、341細胞を集め、高分子RNAをグアニジン塩酸法で抽出、60℃で5分間処理(20mMPPS、pH7.0、5mM酢酸ナトリウム、1mMEDTA)後、1.2%アガロース・ゲル(同バッファー)にて、電気泳動(40V、16h)を行った。その後、ニトロセルロースへトランスファーし、 ^{32}P -MMTV-cDNA (env に特異的なcDNA)をハイブリダイズし、X線フィルムによるオートラジオグラムを作成した。その後、オートラジオグラムより35Sおよび24S RNAのバンドの強度をデンストメーターで測定することにより、RNA発現量を測定し、被験物質の無添加の場合と比較して、RNA発現抑制割合を算出した。その結果を示したのが表2であり、用いた被験物質は MMTV 遺伝子発現抑制

表1

リグニン配糖体のポリ(ADP-リボース)グリコヒドラーゼ阻害活性

リグニン配糖体濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ポリ(ADP-リボース) グリコヒドラーゼ活性(%)
0	100
0.3	86
1.0	24
3.0	4

試験例2.

遺伝子発現に対する阻害効果

本試験で用いた遺伝子発現系は、嚢腫コルチコイド感受性遺伝子である、マウス乳癌ウイルス(MMTV)遺伝子を持つ、マウス乳癌細胞である341株を使用した。本細胞は、嚢腫コルチコイド存在下において、35S RNAと、さらにスプライシングを受けた24S RNAの2種類を発現す

作用を示した。

表2

リグニン配糖体の乳癌ウイルス(MMTV)遺伝子発現に対する作用

デキサメタゾン (10^{-6}M)	リグニン配糖体 ($30\mu\text{g}/\text{ml}$)	35S、24S バンドの感光度	
1	+	-	++++
2	-	+	+
3	-	-	+
4	+	+	++

1は陽性対照、2、3は陰性対照、4は実験群
試験例3.

マウス実験腫瘍に対する制癌効果

マウスの腹腔内に、ザルコーマ180腫瘍細胞を 1×10^6 個移植し、移植後1~4日間被験物質を腹腔内に連続投与した。抗腫瘍活性は、生理食塩液投与群との比較による生存率より求めた。

腫瘍移植後45日目にて実験終了とした。その結果を示したのが表3であり、用いた被験物質は制癌作用を示した。

表3

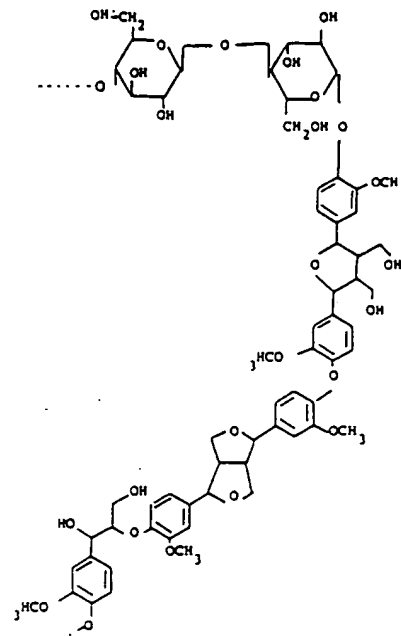
マウス腫瘍ゲルコーマ180に対する
リグニン配糖体の制癌作用

試料	Dose (mg/kg)	T/C (%)
ナシ		100
リグニン配糖体	40×4	135
	20×4	177
	10×4	157
	5×4	122

リグニン配糖体は移植日翌日から4日間連日投与した。

図面は本発明リグニン配糖体の推定構造を示す。

特許出願人 株式会社 ミドリ十字
代理人 弁理士 高島 一



手続補正書 (方式)

平成2年11月20日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成2年特許願第113049号

2. 発明の名称

リグニン配糖体およびその用途

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名(名称) 株式会社 ミドリ十字

4. 代理人 541

住所 大阪市中央区平野町三丁目3番9号
(湯木ビル)

電話 (06) 227-1156

高島国際特許事務所

氏名 弁理士 (8079) 高島 一

5. 補正命令の日付

平成2年7月31日(発送日)

6. 補正の対象

明細書の「図面の簡単な説明」の欄

7. 補正の内容

(1)別紙の通り、明細書第19頁を差し替える。

(2)補正の対象に記載した以外は内容に変更なし。

特許

腫瘍移植後45日目にて実験終了とした。その結果を示したのが表3であり、用いた被験物質は制癌作用を示した。

表3

マウス腫瘍ゲルコーマ180に対する
リグニン配糖体の制癌作用

試料	Dose (mg/kg)	T/C (%)
ナシ		100
リグニン配糖体	40×4	135
	20×4	177
	10×4	157
	5×4	122

リグニン配糖体は移植日翌日から4日間連日投与した。

4. 図面の簡単な説明

図面は本発明リグニン配糖体の推定構造を示す。

特許出願人 株式会社 ミドリ十字
代理人 弁理士 高島 一